



FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

TRABAJO FIN DE GRADO

**TÍTULO: INHIBIDORES DE GSK3 β EN EL
TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE
ALZHEIMER**

Autor: María Mateos Jiménez

D.N.I.: 05313130S

Tutor: José Carlos Menéndez Ramos

Convocatoria: Febrero 2016

1. RESUMEN

Introducción y antecedentes: La terapia farmacológica disponible actualmente para tratar la enfermedad de Alzheimer posee una eficacia limitada y no altera el curso de la enfermedad. *Objetivos:* Revisión bibliográfica de GSK3 β y sus inhibidores. *Metodología:* La herramienta BUCea y el programa ChemSketch® han sido utilizados para recopilar datos y crear las estructuras químicas expuestas. *Resultados y discusión:* GSK3 β posee un rol vital en la patogénesis de la enfermedad, por lo que diferentes inhibidores han sido desarrollados. *Conclusión:* Los inhibidores de GSK3 β son una alternativa terapéutica prometedora.

2. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

2.1 Epidemiología

Se estima que en el mundo hay 46.8 millones de personas con demencia en el año 2015 y se espera que este número se duplique cada 20 años, alcanzando los 131.5 millones en el 2050.^[1]

Los factores genéticos implicados en la aparición temprana de la EA son tres genes (APP, PSEN1 y PSEN2) que codifican proteínas relacionadas con la escisión de la proteína precursora amiloidea (APP) y la generación del péptido A β , mientras que desde hace más de una década el alelo APOE ϵ 4 situado en el cromosoma 19q13 ha sido el único señalado como responsable de la aparición tardía de la enfermedad. No obstante, recientes estudios de asociación del genoma completo (GWAS) han identificado más de 20 nuevos loci susceptibles.^[2-8]

Entre los factores de riesgo no genéticos se encuentran los accidentes cerebrovasculares, la elevada presión arterial, la diabetes mellitus tipo II, un bajo o elevado peso corporal, la dislipemia, el síndrome metabólico, el tabaquismo y los traumatismos cerebrales. Para prevenirlos es aconsejable el consumo de una dieta mediterránea, el ejercicio físico y la participación en actividades intelectuales estimulantes.^[9]

2.2 Etiopatogenia

Existen múltiples hipótesis propuestas para explicar la patogenia de la EA, incluyendo la predisposición genética, el estrés oxidativo, la disrupción de la homeostasia del calcio y la desregulación hormonal, inflamatoria-inmunológica, vascular y del ciclo celular. No obstante, la hipótesis de la cascada amiloidea junto con la hiperfosforilación de la proteína tau es la más aceptada.^[10]

En la hipótesis de la cascada amiloidea, la escisión proteolítica de APP en el aparato de Golgi mediante O-glicosilación es fundamental. En una situación fisiológica, APP es inicialmente escindida por la α -secretasa entre los residuos Lys16 y Leu17, liberando un fragmento C83 carboxi-terminal y sAPP α , un péptido soluble con posible rol neuroprotector; es la vía no amiloidogénica. Por el contrario, en la situación patológica APP es escindida inicialmente por la β -secretasa, liberando sAPP β y un fragmento carboxi-terminal que vuelve a ser escindido por la γ -secretasa, generando los péptidos A β ₄₀ y A β ₄₂; es la vía amiloidogénica. Aunque ambos péptidos se han encontrado en las placas seniles extracelulares, A β ₄₂ es considerado más neurotóxico ya que posee mayor tendencia a agregarse, hecho importante ya que las especies oligoméricas y protofibrilares son consideradas facilitadoras de la hiperfosforilación de tau.^[11,12]

Tau es una proteína asociada a microtúbulos codificada por un gen localizado en el cromosoma 17q21 que se expresa principalmente en neuronas del SNC. La anormal o excesiva fosforilación de tau reduce su afinidad por los microtúbulos causando una disfunción microtubular y del transporte axonal que eventualmente degenera en disfunción sináptica y pérdida neuronal. Asimismo, las moléculas de tau hiperfosforiladas tienden a autoensamblarse en filamentos bien helicoidalmente apareados bien rectos formando ovillos neurofibrilares intracelulares, así como a secuestrar moléculas de tau normales en dichos agregados.^[13,14]

2.3 Diagnóstico y biomarcadores

La EA puede clasificarse en EA de tipo familiar, si existen uno o más casos de parientes de primer grado correctamente diagnosticados, y en EA de tipo esporádico, si no se da esta circunstancia. Además, si los síntomas aparecen antes de los 65 años decimos que se trata de inicio precoz, mientras que si aparecen después decimos que se trata de inicio tardío.^[15] Varios síntomas aparecen de manera consistente, como son la depresión, apatía, agitación, demencia y los trastornos del sueño.^[16]

En la actualidad, la EA solo puede ser diagnosticada fiablemente post mortem, aunque biomarcadores detectados en plasma y líquido cefalorraquídeo, así como ciertas técnicas de neuroimagen, contribuyen a mejorar la especificidad en un diagnóstico temprano.^[17]

En la EA familiar los niveles detectados en plasma se encuentran elevados, mientras que en la EA esporádica los niveles elevados indican factor de riesgo y los niveles disminuidos o la disminución del ratio A β ₄₂/A β ₄₀ señalan el inicio de la enfermedad.^[9]

Por otro lado, en los estadios iniciales de la enfermedad los niveles en líquido cefalorraquídeo de $A\beta_{42}$ están disminuidos, mientras que los de tau total y p-tau están elevados.^[18]

En relación con las técnicas de neuroimagen, destaca el uso de MRI (magnetic resonance imaging), PET (positron emission tomography) y SPECT (single photon emission computed tomography).

En la EA temprana, a través del MRI estructural podemos observar una atrofia del lóbulo temporal medio; si se trata de la forma tardía podemos apreciar que la atrofia incluye el córtex posterior, lóbulo occipital, córtex del cíngulo posterior y precúneo.

En el MRI funcional, los cambios en la concentración de desoxihemoglobina (BOLD-fMRI) miden las alteraciones en el flujo sanguíneo cerebral, y en condiciones patológicas la señal de BOLD-fMRI se encuentra disminuida en el lóbulo temporal medio, en el lóbulo parietal y en el hipocampo.

Utilizando PET se aprecia la disminución del metabolismo de la glucosa presente en pacientes con EA utilizando 18-F-fluorodesoxiglucosa. Existen también radiofármacos como PIB (Pittsburg Compound B), el cual se une específicamente a las placas seniles corticales y estriales, o FDDNP (derivado de malononitrilo), el cual se une tanto a las placas seniles como a los ovillos neurofibrilares.^[9,18]

Asimismo, existen radiofármacos empleados en SPECT que se unen a receptores muscarínicos (^{123}I -QNB), nicotínicos (^{123}I -5IA-85380) y transportadores vesiculares de acetilcolina (^{123}I -IBVM) que evidencian un descenso de la actividad colinérgica en pacientes con EA.^[9]

2.4 Tratamientos disponibles. Limitaciones.

Dado que la acetilcolinesterasa (AChE) promueve la formación de placas seniles e hidroliza rápidamente la acetilcolina, una estrategia es la administración de inhibidores. El primero aprobado por la FDA fue la tacrina (1993), pero debido a su elevada hepatotoxicidad su uso no está recomendado. En los siguientes años se aprobaron el donepezilo (1996), la rivastigmina (2000) y la galantamina (2001).^[19]

El donepezilo ($\text{IC}_{50} = 5.7 \text{ nM}$) es una piperidina que inhibe de forma rápida y reversible, su metabolismo es dependiente de P450 y posee una semivida de 70h. Los grupos bencilpiperidina e indanona de la molécula interactúan con los anillos indólicos de los Trp84 y Trp279 de la enzima.

La rivastigmina ($IC_{50} = 4.150 \text{ nM}$) es un fenilcarbamato que inhibe de forma lenta y reversible, su metabolismo no es dependiente de P450 y posee una semivida de 1-2h. El grupo carbamato es responsable de establecer una unión covalente con el sitio activo de AChE.

La galantamina ($IC_{50} = 800 \text{ nM}$) es un alcaloide de fenantreno aislado de diferentes especies de la familia *Amaryllidaceae* que inhibe competitivamente a la enzima. Su metabolismo es dependiente de P450 y posee una semivida de 5-7h.^[20]

Por otro lado, existe una gran evidencia que muestra que A β provoca un flujo excesivo de calcio al interior de las neuronas, activando los receptores N-metil-d-aspartato (NMDA) y resultando en una cascada de citotoxicidad oxidativa y apoptosis.

La memantina, aprobada en 2003, es un antagonista no competitivo de dichos receptores NMDA que, al interaccionar con una zona cercana al sitio de unión del magnesio en la AChE, puede reducir dicha excitotoxicidad y permitir al mismo tiempo que el receptor se active fisiológicamente ($IC_{50} = 0.54\mu\text{M}$). Su metabolismo no es dependiente de P450 y posee una semivida de 60-100h.^[21,22]

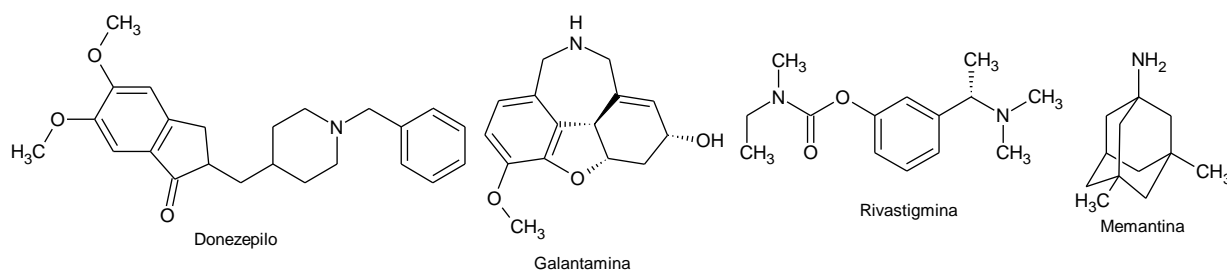


Fig.1. Fármacos actualmente disponibles para el tratamiento de la EA.

Por tanto, actualmente tan solo se dispone de opciones terapéuticas de eficacia limitada para aliviar los síntomas y que no alteran el curso de la enfermedad.^[19]

3. OBJETIVOS

La terapia basada en tau es de gran interés ya que los ovillos neurofibrilares se correlacionan mejor con el grado de demencia presente en la EA que las placas seniles. En efecto, β -amiloidosis en ausencia de ovillos neurofibrilares no produce demencia, mientras que la degeneración neurofibrilar en ausencia de placas seniles se ha observado en diversas tautopatías clínicamente caracterizadas por la presencia de demencia.^[23]

Por ello, y dadas las limitaciones de los tratamientos actuales, la presente revisión bibliográfica analiza la enzima GSK3 β como potencial diana terapéutica, así como los fármacos que la modulan mediante inhibición.

4. METODOLOGÍA

La recopilación de datos ha sido realizada mediante el uso de la herramienta BUCea la cual permite, mediante una única consulta, buscar simultáneamente en las múltiples bases de datos y colecciones electrónicas suscritas por la Biblioteca Complutense. Dicha búsqueda se realizó por palabras clave y estuvo limitada a textos completos en línea, escritos en inglés o español, con fecha de publicación igual o posterior al 2000 y pertenecientes a cualquier biblioteca UCM. Las estructuras químicas expuestas han sido creadas con el programa ChemSketch®.

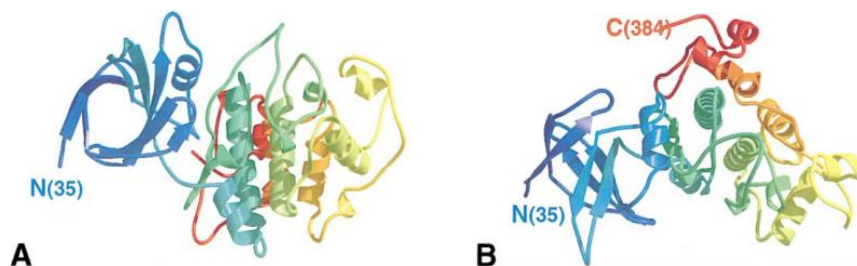
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Características de GSK3 β

Debido al rol que la serina/treonina quinasa GSK3 posee en varios procesos biológicos, surge la necesidad de un mejor conocimiento acerca de su secuencia, estructura y regulación.

En el ser humano GSK3 está expresada como dos isoenzimas codificadas por dos genes diferentes, los cuales están localizados en los cromosomas 3 (GSK3 β) y 19 (GSK3 α). No obstante, ambas isoenzimas comparten el 84% de la secuencia primaria general y el 98% de la secuencia del sitio catalítico.^[24] GSK3 β es una proteína de 47 kDa cuya estructura primaria está constituida por 420 aminoácidos. Su estructura cristalizada solo ha evidenciado una densidad electrónica clara para los 351 residuos incluidos entre Lys35 y Ser386, apareciendo como estructuras desorganizadas los segmentos peptídicos que preceden al residuo 35 y que siguen al residuo 386.

El dominio N-terminal (35-134) consta de siete estructuras en β -lámina encadenadas en forma de barril- β ortogonal, donde las β -láminas 5° y 6° se encuentran unidas por una corta α -hélice (94-104) equivalente a la hélice C presente en las proteínas quinasas dependientes de AMPc, y donde la β -lámina 7° conecta con el resto de la proteína mediante una α -hélice (138-149). La parte central del dominio α -hélice (152-342) posee una topología similar a la región equivalente en las proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPK), pero a partir del residuo 342, GSK3 β se aleja del modelo de plegamiento de las MAPKs y forma una serie de hélices cortas y lazos (342-386) que se empaquetan orientándose hacia la hélice más larga (155-175).



Mientras que la conformación de la secuencia activadora (210-GEPNVSYICSR-220) presente en el dominio α -hélice de la enzima sugiere que GSK3 β puede activarse en ausencia de fosforilación, los residuos Arg96, Arg180 y Lys205 forman un grupo básico de residuos, el sitio catalítico, que interacciona con el fosfato del sustrato y transforma la señal representada por el sustrato fosforilado en activación, dándose una interconexión activadora vía interacciones polares entre la secuencia activadora y el grupo catalítico.^[25]

Diversos análisis de los sitios fosforilados por GSK3 β sugieren que el motivo de sus sustratos se ajusta a la secuencia (Ser/Thr)-(Pro-X)-X-X-(Ser/Thr), donde el residuo Ser/Thr del dominio C-terminal está ya fosforilado (sitio P₀), y que GSK3 β fosforila preferentemente en posición P₀+4, teniendo como diana a una Ser/Thr que precede a un residuo Pro.^[24,25]

GSK3 β es constitutivamente activa y diferentes modificaciones post-traduccionales regulan su actividad. Además, como muchos sustratos de GSK3 β requieren una fosforilación previa o “priming”, la actividad de la primera quinasa puede limitar la actividad de GSK3 β .

El principal mecanismo inhibitorio es la fosforilación de Ser9 promovida por la insulina vía Akt, por la cual el dominio N-terminal fosforilado actúa como pseudosustrato y bloquea el sitio catalítico.

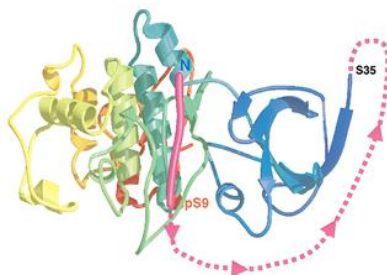


Fig.3. Autoinhibición de GSK3 β por el dominio N-terminal.

Por otro lado, cuando la vía Wnt canónica es activada, la proteína Dvl desplaza a GSK3 β del complejo APC/axina/GSK3 β y GSK3 β se une a la proteína (GBP)/Frat-1, donde ve inhibida su actividad.^[24,26,27] Asimismo, esta vía posiblemente regula la dimerización de GSK3 β a través de uniones de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas y polares, provocando el bloqueo del sitio catalítico y, por tanto, inactivando a GSK3 β .^[24]

5.2 Hipótesis de GSK3 en la enfermedad de Alzheimer

GSK3 β está involucrada en diversos procesos celulares que incluyen el metabolismo del glucógeno, la transcripción génica, la apoptosis y la estabilidad microtubular. Su sobreexpresión está relacionada con la patogénesis de EA, explicando la aparición de trastornos en la memoria, la hiperfosforilación de tau, el aumento de la producción de A β y las placas locales asociadas a la respuesta inmunitaria mediada por microglía.

La supresión de la señalización de las vías de la insulina y Wnt daña a la potenciación a largo plazo (LTP), la cual es considerada uno de los mecanismos celulares principales que subyace al aprendizaje y la memoria. Asimismo, los inhibidores de GSK3 β bloquean la depresión a largo plazo, esto es, un tipo de plasticidad neuronal en el que se hay una reducción de la eficacia de la sinapsis neuronal.

Varios sustratos de GSK3 β están involucrados en la remodelación sináptica. APC y las proteínas mediadoras de la respuesta a colapsina (CRMPs) influyen en los conos de crecimiento, y las proteínas CREB (cAMP responsive element-binding) son moduladoras de la memoria; todas ellas aparecen hiperfosforiladas e inhibidas.

Por otro lado, estudios *in vitro* y en cultivo de células-modelo de neurodegeneración han evidenciado que GSK3 hiperfosforila a la proteína tau tanto en los sitios diana (“primed sites”) como en los no diana (“non-primed sites”), resultados consistentes con los obtenidos en ratones transgénicos. En células neuroblásticas humanas, la insulina produce un aumento transitorio seguido de una reducción de la fosforilación de tau, las cuales están correlacionadas con la activación y subsecuente desactivación de GSK3 β . Dickkopf, un regulador negativo de la vía de señalización Wnt cuyos niveles aparecen aumentados en EA, también promueve la fosforilación de tau mediante la activación de GSK3 β . Finalmente, se ha observado que PS-1 se une a GSK3 β y tau, y que las formas mutadas de PS-1 se unen a GSK3 β más eficazmente, resultando también en un aumento de la fosforilación de tau. Es interesante que dichas PS-1 mutadas en la EA de tipo familiar inhiban la señalización PI3-quinasa/Akt dependiente de PS-1 facilitando la actividad de GSK3 β , y por tanto la hiperfosforilación de tau, ya que este mecanismo

explica cómo mutaciones en la EA de tipo familiar pueden potencialmente conducir a una rápida progresión de la enfermedad.

Cabe destacar que es GSK3 α , y no GSK3 β , la enzima que regula la escisión de APP, resultando en un aumento de la producción de A β . A su vez, la exposición de las neuronas a la presencia de A β provoca la inhibición de la señalización de PI3-quinasa, aumentando la actividad de GSK3 β . La insulina, por su parte, administrada vía intranasal altera favorablemente el ratio A β 40/42 provocando mejoras cognitivas, y aumenta la expresión de la proteasa de degradación de insulina y A β (IDE).^[27]

Finalmente, la acumulación de placas seniles alrededor de las células microgliales y el aumento de la expresión de mediadores de la inflamación en el tejido cerebral de sujetos con EA es ampliamente conocido. Dado que la regulación periférica de la actividad de GSK3 β es crítica para la diferenciación, migración y secreción de citoquinas proinflamatorias, una mala regulación de GSK3 β podría conducir a una liberación sostenida de mediadores neurotóxicos proinflamatorios mediados por microglía, dañando a las neuronas vecinas y contribuyendo al proceso neurodegenerativo. No obstante, la función de GSK3 β en la respuesta inflamatoria cerebral aún no se conoce completamente.^[12,24]

5.3 Proteína tau. Rol de GSK3 β en la hiperfosforilación de tau

Tau es una proteína asociada a microtúbulos cuya función principal es la de estabilizar el citoesqueleto neuronal.

Estructuralmente, tau está subdividida en cuatro regiones: una región ácida en el dominio N-terminal, una región rica en prolina, una región responsable de su unión a los microtúbulos que contiene cuatro dominios repetidos, y una región C-terminal.

Dependiendo de la presencia o no del exón 10, las isoformas de tau se denominan R4 (con el exón 10), o R3 (sin el exón 10), y dependiendo de la presencia o no del inserto N-terminal, se denominan 0N (sin inserto N-terminal), 1N (con un inserto N-terminal) o 2N (con dos insertos N-terminal). Por tanto, existen seis posibles combinaciones que originan seis isoformas de tau: 4R/2N, 4R/1N, 4R/0N, 3R/2N, 3R/1N, 3R/0N y 3R1N y 3R0N, y las seis aparecen hiperfosforiladas y agregadas en ovillos neurofibrilares en el tejido cerebral de pacientes con EA a pesar de que en condiciones fisiológicas tau es una proteína altamente hidrofílica, y por tanto soluble y termoestable.^[23,28]

Cada uno de los cuatro dominios R1-R4, también llamados MBDs (microtubule-binding domains), contienen el motivo consensuado KXGS, el cual puede ser fosforilado en una

serina y provocar una disminución en la afinidad de tau por los microtúbulos, desestabilizando así el citoesqueleto neuronal y alterando las funciones asociadas a tau.^[29]

La modificación post-traducciona l más comúnmente descrita en tau es la fosforilación. De los 85 sitios putativos fosforilables en tau, 45 son serinas (53% de los sitios fosforilables), 35 son treoninas (41%) y 5 son tirosinas (6%). Existe evidencia de que la fosforilación de los residuos S262, S293, S324 y S356 del motivo KXGS, así como de los residuos T231 y S235, disminuye la afinidad de unión de tau a los microtúbulos.^[28]

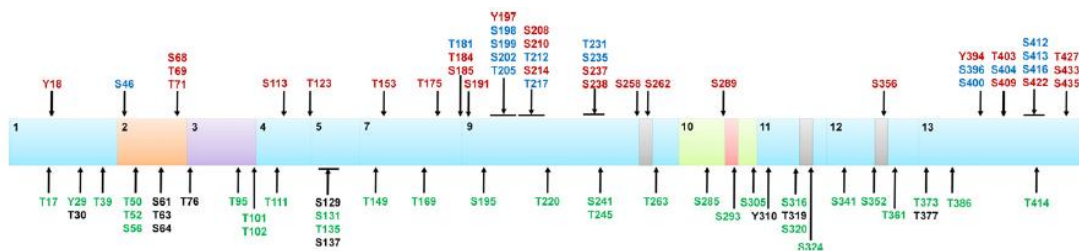


Fig.4. Sitios de fosforilación de tau. Los sitios encontrados fosforilados en cerebros de pacientes con EA aparecen indicados de color marrón.

En condiciones fisiológicas tau contiene solo 2-3 moles de fosfato por mol de proteína, y dado que posee largas regiones cargadas positiva y negativamente no conducentes a establecer interacciones hidrofóbicas, ambos extremos amino y carbonil terminales de la región de unión a microtúbulos inhiben su autoensamblaje en filamentos, apareciendo solamente una estructura en β -lámina en los dominios R2 y R3. No obstante, en condiciones patológicas tau se encuentra entre 3-4 más veces hiperfosforilada, y en este estado, la inhibición por parte de los extremos amino y carbonil terminales desaparece, resultando en su polimerización en ovillos neurofibrilares, los cuales no se unen a la tubulina e inhiben del ensamblaje de los microtúbulos.

Cabe destacar que un 40% aproximadamente de la tau hiperfosforilada se encuentra sin polimerizar en el citosol, y su efecto tóxico radica en actuar como un factor de nucleación, secuestrando unidades de tau normal, así como a las proteínas MAP1/2.

Asimismo, la hiperfosforilación de tau y su acumulación en el compartimento somato-dendrítico puede ser responsable de las alteraciones morfológicas que sufren el retículo endoplasmático rugoso y el aparato de Golgi, los cuales se encuentran asociados a tau, así como de la anormal N-glicosilación que sufre tau.^[23]

GSK3 β fosforila a tau en 42 sitios, 29 de los cuales han sido encontrados fosforilados en el tejido cerebral de pacientes con EA. La sobreexpresión de GSK3 β en ratones

transgénicos induce la hiperfosforilación de tau y consecuentemente neurodegeneración, y en líneas celulares causa su apoptosis, sugiriendo que la fosforilación de tau por GSK3 β puede ser tóxica. Estos resultados son consistentes con los obtenidos en cultivos de neuronas de la región del hipocampo de ratas que habían sido expuestas a A β . En modelos animales, además se produce respuesta inflamatoria, aumento en la producción de A β , reducción de la síntesis de acetilcolina y déficit de memoria. En pacientes con EA GSK3 β se co-localiza con los ovillos neurofibrilares y su actividad se ha observado aumentada en el córtex frontal. Todo ello indica que GSK3 β constituye una diana terapéutica prometedora.^[29]

5.4 Terapia basada en tau: cationes inhibidores de GSK3 β

El litio fue descubierto en 1996 por Klein y Melton como el primer inhibidor reversible de GSK3 β con una IC₅₀ *in vitro* de 2mM aproximadamente.^[30] La actividad de GSK3 β es inhibida por el litio mediante dos mecanismos distintos e interrelacionados: de forma directa al impedir la unión del ión Mg⁺² al sitio catalítico de GSK3 β , y de forma indirecta al inducir la fosforilación en Ser9, la cual es seguida de la activación intracelular de quinasas o de la inhibición intracelular de fosfatasas. Finalmente, el litio puede disminuir la disponibilidad de GSK3 β inhibiendo la transcripción del ARNm, y por tanto, reduciendo su expresión proteica.^[30,31]

Mientras que el mecanismo de acción por el cual el litio fosforila a GSK3 β sigue investigándose, como inhibidor directo se sabe que compite con los iones de magnesio pero no con el sustrato o el ATP para unirse a la enzima, y se ha sugerido la existencia de dos sitios de unión involucrados en este tipo de inhibición basándose en el hecho de que el ión Be⁺² es un potente inhibidor de GSK3 β que compite tanto con el Mg⁺² como con el ATP.^[29-31]

Otro mecanismo de acción relevante del litio es la inhibición de inositol monofosfato (IMP) e inositol polifosfato (IPP), por la cual se evita la recaptación de inositol, lo que conduce a su depleción y a la subsecuente inhibición del ciclo del fosfoinositol, así como a la supresión de la formación de su metabolito inositol trifosfato (IP3), induciendo la autofagia de proteínas con tendencia a agregarse.

Los estudios preclínicos indican que el litio puede atenuar la patología producida por la presencia de A β y la hiperfosforilación de tau, así como mejorar la función cognitiva. Su perfil farmacocinético también es ventajoso, pues penetra en las células fácilmente, es absorbido del tracto gastrointestinal en 6-8h, no genera metabolitos activos y no se

une a proteínas plasmáticas. Estudios clínicos en pacientes con EA no arrojan resultados concluyentes, y dado que también inhibe a otras enzimas aparte de GSK3 β , su uso crónico puede ser neurotóxico.^[30,32]

Digna de mencionar también es la inhibición indirecta de GSK3 β por el tungsteno, que suele presentarse como sal inorgánica de tungsteno sódico o su dihidrato ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). El tungsteno, también denominado wolframio, activa a quinasas reguladas por señales extracelulares $\frac{1}{2}$ (ERK1/2), induciendo la fosforilación de GSK3 β en Ser9. El tungsteno sólo reduce la fosforilación de tau en secuencias diana (“primed sequences”), que son Ser198, Ser199, Ser202 y Thr231, disminuyendo así el grado de interacción de tau con los microtúbulos característica de la EA.^[33] Sorprendentemente, este compuesto tiene un perfil toxicológico bajo y se encuentra actualmente en ensayos clínicos de fase I como agente anti-obesidad.^[30]

5.5 Terapia basada en tau: inhibidores ATP-competitivos de GSK3 β

Los inhibidores que compiten con el ATP por el sitio activo de GSK3 β y señalados como inhibidores de la fosforilación de tau pueden ser agrupados, en función de si se obtienen a partir de organismos marinos (indirrubinas, himenialdisinas, meridianinas), o a partir de la síntesis orgánica (aminopirimidinas, paullonas).^[30]

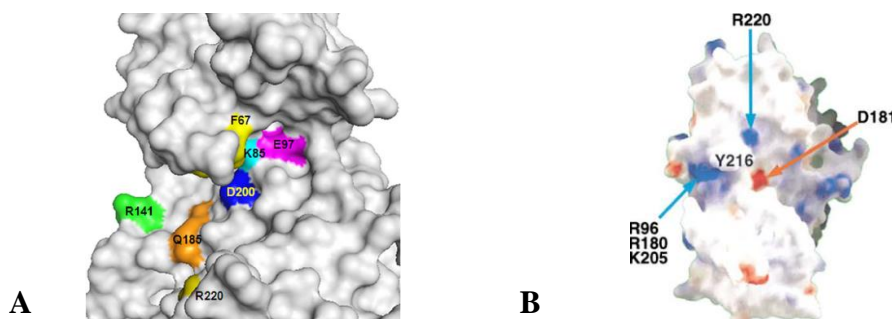


Fig.5. Sitio de unión de los inhibidores ATP-competitivos en GSK3 β . (A) F67 (amarillo) localiza el lazo que interacciona con el ATP. (B) Superficie de GSK3 β coloreado en función de su potencial electrostático: azul, positivo; rojo, negativo.

Las indirrubinas son alcaloides con estructura bis-indol que constituyen los pigmentos rojizos producidos por moluscos de las familias *Muricidae* y *Thaididae*. La glándula hipobranquial de estos gasterópodos contiene precursores incoloros (sulfato de indoxilo, su derivado mercaptano y sus derivados bromados) que liberan varios indoxilos tras su hidrólisis por la purpurasa, que expuestos a la luz y oxígeno, se dimerizan para formar mezclas de índigo e indirrubinas, mayoritariamente 6,6'-dibromo-índigo, aunque

también varias indirrubinas sustituidas. Al aislar 6-bromoindirrubina se comprobó que inhibía tanto a GSK3 β (IC_{50} = 45 nM) como a CDKs, aunque 10 veces menos potentemente a estos últimos. Dicha preferencia puede explicarse por la presencia de Leu132 en GSK3 β , que interacciona mediante fuerzas de van der Waals con el bromo. Además, la indirrubina provoca un impedimento estérico que impide el acceso a la tirosina quinasa responsable de la fosforilación de Tyr216/276, pudiendo generar un efecto inhibitorio secundario en GSK3 β . La obtención de su análogo sintético 6-bromoindirrubin-3'-oxima (6-BIO) condujo a un incremento en su actividad inhibitoria y en su solubilidad, aunque la selectividad hacia GSK3 β se vio ligeramente disminuida.^[34,35] La actividad biológica de 6-BIO ha sido evaluada en diversos sistemas neuronales, y ha probado reducir la fosforilación de tau en cultivos de neuronas corticales. No obstante, existen discrepancias en estudios *in vivo*.^[30]

Las himenialdisinas son alcaloides que se pueden encontrar en los extractos de las esponjas marinas *Axinella verrucosa* y *Acanthella aurantiaca*, y algunos estudios apuntan que actúan protegiendo a las esponjas de la depredación. Al aislar a himenialdisina se comprobó que era un potente inhibidor de GSK3 β (IC_{50} = 35 nM), aunque más selectivo para CDK5, y se ha demostrado tanto en estudios *in vitro* como en estudios *in vivo* que bloquea la fosforilación de tau. Un análogo suyo aislado de la esponja marina *Phakellia flabellate*, la debromohimenialdisina, también inhibe la actividad de varias quinasas, incluyendo a CDK5 (IC_{50} = 0.4 nM), CK1 δ (IC_{50} = 0.1 nM) y GSK3 β (IC_{50} = 0.2 nM) entre otras.^[34,36] No obstante, es interesante remarcar que es otro metabolito de la esponja, la dibromocantarelina, la única que exhibe un efecto inhibitorio significativo y de forma selectiva hacia GSK3 β (IC_{50} = 3 μ M). Los tres anillos de su estructura están encajados en la cavidad hidrofóbica formada por los residuos Val110, Leu132, Leu188 y Cys199, y también podemos encontrar la unión por enlace de hidrógeno conservado entre las quinasas establecido entre el átomo N1 y el oxígeno del carbonilo de Val135; otra unión débil por enlace de hidrógeno entre los oxígenos del anillo A y la cadena lateral de Arg141 explica la selectividad de 1H-quinazolin-4-onas y benzo(e)(1,3)oxacin-4-onas por GSK3 β . El anillo de guanidina cargado positivamente también establece interacciones electrostáticas con los residuos de su alrededor, de tal forma que el azufre de Cys199 queda más próximo a los átomos N3 y N4, hecho importante ya que proporciona nuevas pistas para el diseño de inhibidores potentes y selectivos.^[37]

Las meridianinas son alcaloides indólicos principalmente obtenidos del tunicado *Aplidium meridianum*, aunque algunas meridianinas también han sido encontradas en tunicados del género *Synoicum* en el Ártico. Estos compuestos inhiben a diversas quinasas, habiéndose encontrado meridianina E como el inhibidor más potente de CDK1/B ($IC_{50} = 0.18 \mu M$), CDK5 ($IC_{50} = 0.15 \mu M$), GSK3 α ($IC_{50} = 0.90 \mu M$), GSK3 β ($IC_{50} = 2.50 \mu M$) y CK1 ($IC_{50} = 0.40 \mu M$).^[34] A pesar de que se han intentado diferentes aproximaciones químicas para preparar inhibidores más selectivos hacia GSK3 β , en todos los casos resultaron más potentes hacia CDKs, y la inhibición a GSK3 β fue marginal.^[30]

Las aminopirimidinas son análogos de purina desarrolladas por la corporación Chiron. Los compuestos CHIR98023, CHIR98014 y CHIR99021 inhiben a la GSK3 β potentemente con valores de K_i inferiores a 100 nMol/L. Mientras que los compuestos CHIR98014 y CHIR99021 mostraron tener una potencia similar inhibiendo a las isoformas α y β de GSK3, destacaron por poseer una selectividad 500 veces superior hacia GSK3 α/β respecto a otras quinasas, entre las que se encuentran CDK2 y ERK2, sus quinasas homólogas más cercanas. Asimismo, CHIR99021 mostró una unión débil ($K_d = 4 \mu M/L$) a un panel formado por 22 receptores farmacológicamente relevantes, así como una baja actividad inhibitoria sobre un panel de 23 enzimas no quinasas (la menor $K_i = 8.3 \mu M/L$ sobre la fosfodiesterasa III). La evaluación *in vitro* de la actividad de CHIR98014 en células neuronales humanas de la línea LUHMES ha probado que a una concentración de 2 μM , CHIR98014 es capaz de disminuir la fosforilación de tau en Ser396, reduciendo la presencia de tau fosforilada en un 93%. En un estudio *in vivo* realizado con ratas P12 se observó una reducción del 40% aproximadamente en la fosforilación de la proteína tau presente en el córtex, así como una presencia 3 veces menor de GSK3 β , pero no de GSK3 α , en el hipocampo. Un estudio 3D-QSAR y de docking molecular demostró la existencia de una interacción fundamental entre pirazolopirimidinas y la Thr138 de GSK3 β para el futuro desarrollo de derivados más selectivos, pues el Thr138 es reemplazado por Asp86 en el sitio activo de CDK2.^[30,38-40]

Las paullonas constituyen una familia de compuestos heterocíclicos donde un anillo de benceno está fusionado con un anillo de azepina: son las benzazepinonas. Tras el estudio de su mecanismo de acción se observó que la interacción entre las paullonas y el residuo Val135 de GSK3 β es mucho más fuerte que la establecida entre las paullonas y el residuo Cys83 de CDK5, y junto con la disminución en la interacción entre las paullonas y el residuo Asp86 de CDK5 advertida al usar el derivado 1-azakenpaullona,

estos datos sugieren que las paullonas podrían utilizarse como inhibidores selectivos de GSK3 β . Un estudio *in vitro* ha demostrado una reducción dosis-dependiente de la fosforilación de tau por alsterpaullona (IC₅₀ = 33nM aproximadamente), resultados consistentes con los obtenidos *in vivo* realizados en células Sf9, en los cuales se detectó que inhibía la fosforilación del epítipo PHF-1, el cual representa la zona de fosforilación más prominente por GSK3 β en la proteína tau, en comparación con otras quinasas prolina-dirigidas.^[30,41,42]

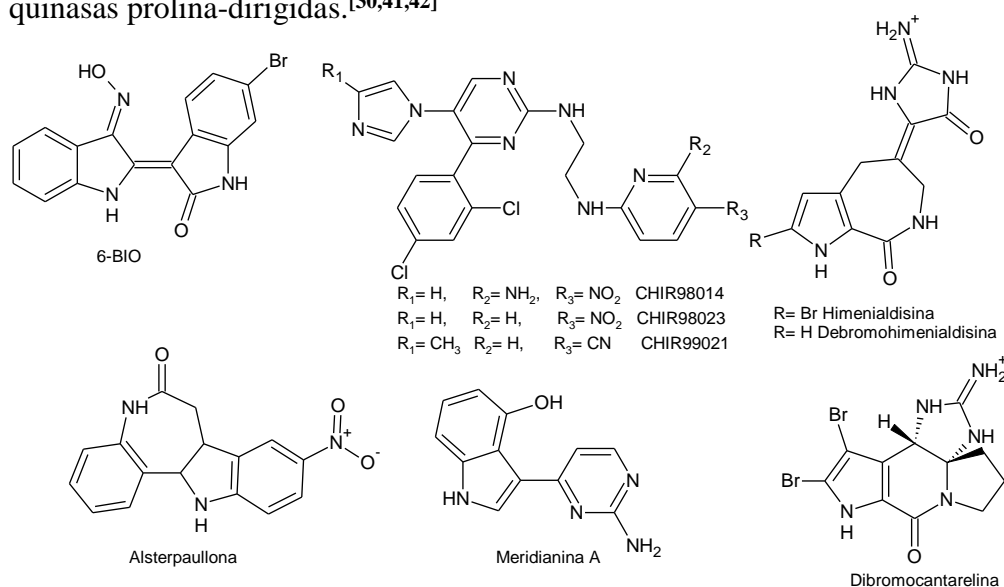


Fig.6. Inhibidores ATP-competitivos de GSK3 β .

5.6 Terapia basada en tau: inhibidores ATP-no competitivos de GSK3 β

Existen diferentes familias de compuestos orgánicos que no compiten con el ATP por el sitio activo de GSK3 β para inhibir a la enzima sino que la modulan alostéricamente o estableciendo enlaces covalentes. Aquellos señalados como inhibidores de la fosforilación de tau pueden ser agrupados en función de si se obtienen a partir de organismos marinos (manzaminas, furanosesquiterpenos) o a partir de la síntesis orgánica (1,2,4-tiadiazolidina-3,5-dionas, halometilcetonas).^[30]

Las manzaminas son alcaloides con estructura β -carbolina descubiertas en las esponjas del océano indo-pacífico. En 1986 la manzamina A fue aislada de la esponja *Haliclona sp.*, aunque fue más tarde cuando se descubrió en estudios *in vitro* su capacidad para inhibir de forma no-competitiva a GSK3 β (IC₅₀ = 10.2 μ M) cuando al incrementar la concentración de ATP su actividad inhibitoria no se veía interferida. En efecto, la manzamina A se une a un bolsillo próximo a la región catalítica de GSK3 β , inhibiendo a la enzima de forma alostérica. Al analizar su estructura para intentar elucidar el grupo

farmacóforo se descubrió que la molécula entera era requerida, y un estudio SAR demostró un incremento de su actividad inhibitoria al introducir diferentes radicales voluminosos en posición 8. Al evaluar su actividad inhibitoria sobre GSK3 β y otras quinasas en un estudio realizado en células neuroblásticas humanas se descubrió que manzamina A solamente inhibía a GSK3 β y a CDK5 con un IC₅₀ igual a 10 y 1.5 μ M, respectivamente. Asimismo, el tratamiento de los cultivos celulares SH-SY5Y con diferentes concentraciones de manzamina A resultó en una disminución en la fosforilación del epítipo Ser396 de tau, el cual es fosforilado específicamente por GSK3 β .^[34,43]

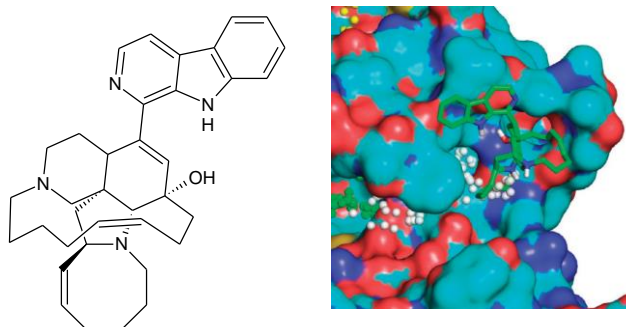


Fig.7. Estructura química y modelo de unión a GSK3 β de Manzamina A.

La palinurina es un furanosesquiterpeno aislado de la esponja marina *Ircina variabilis* que también inhibe a GSK3 β de forma alostérica. Se ha propuesto que la palinurina se une a un bolsillo localizado en la zona N-terminal de la enzima, donde Lys86 interacciona por enlace de hidrógeno y electrostáticamente con el grupo hidroxilo desprotonado del anillo tetrónico, y Tyr56 establece una unión por enlace de hidrógeno con el grupo carbonilo del anillo. Esta unión entre la palinurina y el bolsillo altera la posición de las β -láminas 3 y 4 del barril- β ortogonal, las cuales contienen un lazo rico en glicina que ve reducida su flexibilidad al aumentar la estabilidad del enlace de hidrógeno establecido entre el grupo hidroxilo de Ser66 y el γ -fosfato del ATP, reduciendo así la accesibilidad del γ -fosfato al sitio activo. Su habilidad para inhibir a un panel de quinasas fue determinada, demostrando una elevada selectividad hacia las isoformas α y β de GSK3 con valores de IC₅₀ iguales a 1.6 y 1.9 μ M, respectivamente, al no poder mostrar un efecto significativo en las otras quinasas del estudio con concentraciones entre 25-100 μ M. Estos resultados fueron corroborados al realizar un alineamiento estructural de las estructuras de las quinasas en 3D, las cuales presentaban al menos un residuo mutado que afecta a la unión de palinurina al bolsillo de GSK3 β . El tratamiento de los cultivos celulares SH-SY5Y con diferentes concentraciones de palinurina reflejó una disminución en la fosforilación del epítipo Ser396 de tau.^[34,44]

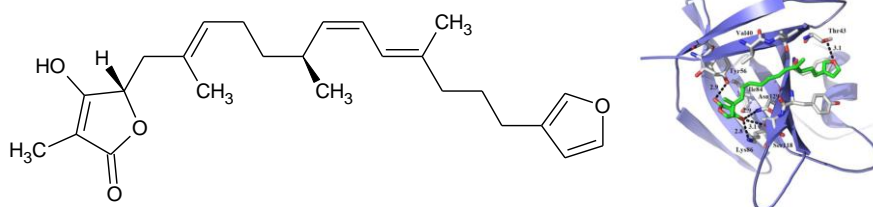


Fig. 8. Estructura química y modelo de unión a GSK3β de Palinurina

Las 1,2,4-tiadiazolidin-3,5-dionas constituyen la primera familia de compuestos heterocíclicos obtenidos mediante síntesis identificados como inhibidores no competitivos de GSK3β. Dos moléculas han sido bien caracterizadas, TDZD-8 y tideglusib ($IC_{50} = 2\mu M$ y $IC_{50} = 0.1-1\mu M$, respectivamente), las cuales no muestran actividad inhibitoria sobre varias quinasas. En relación con el mecanismo de acción, la interacción de estos compuestos con el residuo Cys199 localizado en la entrada del sitio de unión del ATP en GSK3β es considerada importante aunque no esencial para la fosforilación de Ser9 en GSK3β, pues al reemplazar dicho residuo en la enzima por Ala no abolió su actividad totalmente. Tideglusib, por su parte, ha probado en varios estudios con animales la reducción de la fosforilación de tau y se encuentra en la actualidad en ensayos clínicos de fase II.^[30,45,46]

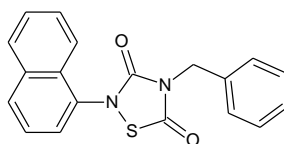


Fig. 9. Estructura química de Tideglusib.

Los derivados de halometilcetona (HMK) son los primeros inhibidores cuya acción es considerada irreversible. En este caso, la inhibición de GSK3β es producida por la formación de una unión covalente (S-C) entre el residuo Cys199 y HMK. Usando una concentración igual a $10\mu M$ de diversos derivados se comprobó que en general no exhiben un efecto inhibitorio significativo en las quinasas Ablk, CAMK II, EGFRK, IRK, MAPK, MEK1K y PKp56, aunque sí en la quinasas proto-oncogénica Src en algunos tumores humanos. Al evaluar *in vitro* su capacidad de unión a diferentes receptores de neurotransmisores, los resultados confirmaron que estos derivados no se les unían, reduciendo así los efectos secundarios potenciales *in vivo*. Asimismo, un estudio realizado en células granulosas del cerebelo probó su eficacia como inhibidores de la fosforilación de tau. De entre todos los compuestos estudiados, HMK-31 ha demostrado una actividad inhibitoria superior ($IC_{50} = 0.5\mu M$).^[30,37,47]

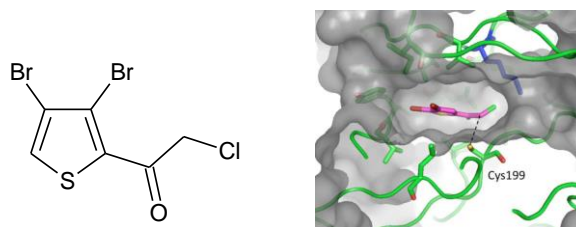


Fig.10. Estructura química y modelo de unión a GSK3 β de HMK-31.

6. CONCLUSIÓN

El rol de GSK3 β en EA es de tal importancia que se han investigado varios inhibidores que han probado su eficacia en modelos celulares y animales, surgiendo así una potencial alternativa terapéutica que cubre las limitaciones de los tratamientos actuales. Estos inhibidores entrañan ciertos riesgos en relación con su selectividad y especificidad hacia GSK3 β , por lo que aquellos que modulan a la enzima alostéricamente o la inhiben de forma covalente están emergiendo como una estrategia especialmente prometedora para un uso más seguro en clínica.^[30]

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] World Health Organization. Dementia: a public health priority. Geneva: *WHO* **2012**
- [2] Harold D, Abraham R, Hollingworth P, Sims R, Gerrish A, Hamshere ML, Pahwa JS, Moskvina V, Dowzell K, Williams A, et al. *Nat. Genet.* **2009**;41:1088–1093
- [3] Lambert JC, Heath S, Even G, Campion D, Sleegers K, Hiltunen M, Combarros O, Zelenika D, Bullido MJ, Tavernier B, et al. *Nat. Genet.* **2009**;41:1094–1099
- [4] Seshadri S, Fitzpatrick AL, Ikram M, DeStefano AL, Gudnason V, Boada M, Bis JC, Smith AV, Carassquillo MM, Lambert JC, et al. *JAMA* **2010**;303:1832–1840
- [5] Hollingworth P, Harold D, Sims R, Gerrish A, Lambert JC, Carrasquillo MM, Abraham R, Hamshere ML, Pahwa JS, Moskvina V, et al. *Nat. Genet.* **2011**;43:429–435
- [6] Naj AC, Jun G, Beecham GW, Wang LS, Vardarajan BN, Buross J, Gallins PJ, Buxbaum JD, Jarvik GP, Crane PK, et al. *Nat. Genet.* **2011**;43:436–441
- [7] Rogaeva E, Meng Y, Lee JH, Gu Y, Kawarai T, Zou M, Katayama T, Baldwin CT, Cheng R, Hasegawa H, et al. *Nat. Genet.* **2007**;39:168–177
- [8] Reitz C, Cheng R, Rogaeva E, Lee JH, Tokuhira S, Bettens K, Sleegers K, Tan EK, Kimura R, Shibata N, et al. *Arch. Neurol.* **2011**;68:99–106
- [9] Reitz C, Mayeux R. *Biochem. Pharmacol.* **2014**;88:640–651
- [10] Hardy J, Selkoe DJ. *Science* **2002**;297:353–356

- [11] Mohandas E, Rajmohan V, Raghunath B. *Indian J. Psychiatry* **2009**;51:55-61
- [12] Small SA, Duff K. *Neuron*. **2008**;60:534-542
- [13] Meraz-Ríos MA, Lira-De León KI, Campos-Peña V, De Anda-Hernández MA, Mena-López R. *J. Neurochem*. **2010**;112:1353-1367
- [14] Medina M, Avila J. *Biochem. Pharmacol*. **2014**; 88:540-547
- [15] Shinohara M, Fujioka S, Murray ME, Wojtas A, Baker M, Rovelet-Lecrux A, Rademakers R, Das P, Parisi JE, Graff-Radford NR, Petersen RC, Dickson DW, Bu G. *Brain* **2014**;137:1533-1549
- [16] McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, Hyman BT, Jack CR Jr, Kawash CH, Klunk WE, Koroshetz WJ, Manly JJ, Mayeux R, Mohs RC, Morris JC, Rossor MN, Scheltens P, Carrillo MC, Thies B, Weintraub S, Phelps CH. *J. Alzheimers Assoc*. **2011**; 7:263–269
- [17] Ballard C, Gauthier S, Corbett A, Brayne C, Aarsland D, Jones E. *Lancet* **2011**;377:1019-1031
- [18] Huded CB, Bharath S, Chandra SR, Sivakumar PT, Varghese M, Subramanian S. *Asian J. Psychiatry* **2015**;13:44-47
- [19] Fan LY, Chiu MJ. *Acta Neurol. Taiwan*. **2010**;19:228-245
- [20] Anand P, Singh B. *Arch. Pharm. Res*. **2013**;36:375-399
- [21] McKeage K. *CNS Drugs* **2009**;23: 881-897
- [22] Limapichat W, Yu WY, Branigan E, Lester HA. Dougherty DA. *ACS Chem. Neurosci*. **2013**;4:255–260
- [23] Iqbal K, Liu F, Gong C-X, Alonso AdelC, Grundke-Iqbal I. *Acta Neuropathol*. **2009**;118:53-69
- [24] Muyllaert D, Kremer A, Jaworski T, Borghgraef P, Devijver H, Croes S, Dewachter I, Van Leuven F. *Genes Brain Behav*. **2008**;7:57-66
- [25] Dajani R, Fraser E, Roe SM, Young N, Good V, Dale TC, Pearl LH. *Cell* **2001**;105:721–732
- [26] O’Leary O, Nolan Y. *CNS Drugs* **2015**;29:1-15
- [27] Hooper C, Killick R, Lovestone S. *J. Neurochem*. **2008**;104:1433-1439
- [28] Martin L, Latypova X, Terro F. *Neurochem. Int*. **2011**;58:458-471
- [29] Martin L, Latypova X, Wilson CM, Magnaudeix A, Perrin ML, Yardin C, Terro F. *Ageing Res. Rev*. **2013**;12:289-309
- [30] Eldar-Finkelman H, Martínez A. *Front. Mol. Neurosci*. **2011**;4:1-18
- [31] Martínez A, Pérez DI. *J. Alz. Dis*. **2008**;15:181-191

- [32] Forlenza, OV, De-Paula, VJ, Diniz, BS. *ACS Chem. Neurosci.* **2014**;5:443-450
- [33] Gómez-Ramos A, Domínguez J, Zafra D, Corominola H, Gomis R, Guinovart JJ, Avila J. *J. Neurosci. Res.* **2006**;83:264-273
- [34] Choi DY, Choi H. *Arch. Pharm. Res.* **2015**;38:139-170
- [35] Meijer L, Skaltsounis A-L, Magiatis P, Polychronopoulos P, Knockaert M, Leost M, Ryan XP, Vonica CA, Brivanlou A, Dajani R, Crovace C, Tarricone C, Musacchio A, Roe SM, Pearl L, Greengard P. *Chem. Biol.* **2003**;10:1255-1266
- [36] Meijer L, Thunnissen AMWH, White AW, Garnier M, Nikolic M, Tsai L-H, Walter J, Cleverley KE, Salinas PC, Wu Y-Z, Biernat J, Mandelkow E-M, Kim S-H, Pettit GR. *Chem. Biol.* **2000**;7:51-63
- [37] Zhang N, Zhong R, Yan H, Jiang Y. *Chem. Biol. Drug Des.* **2011**;77:199-205
- [38] Ring DB, Johnson KW, Henriksen EJ, Nuss JM, Goff D, Kinnick TR, Ma ST, Reeder JW, Samuels I, Slabiak T, Wagman AS, Hammond ME, Harrison SD. *Diabetes* **2003**;52:588-595
- [39] Selenica M-L, Jensen HS, Larsen AK, Pedersen ML, Helboe L, Leist M, Lotharius J. *Br. J. Pharmacol.* **2007**;152:959-979
- [40] Dessalew N, Patel DS, Bharatam PV. *J. Mol. Graph. Model.* **2007**;25:885-895
- [41] Leost M, Schultz C, Link A, Wu Y-Z, Biernat J, Mandelkow E-M, Bibb JA, Snyder GL, Greengard P, Zaharevitz DW, Gussio R, Senderowicz AM, Sausville EA, Kunick C, Meijer L. *Eur. J. Biochem.* **2000**;267:5983-5994
- [42] Chen Q, Cui W, Cheng Y, Zhang F, Ji M. *J. Mol. Model.* **2011**;17:795-803
- [43] Hamann M, Alonso D, Martín-Aparicio E, Fuertes A, Pérez-Puerto MJ, Castro A, Morales S, Navarro ML, del Monte-Millán M, Medina M, Pennaka H, Balaiah A, Peng J, Cook J, Wahyuono S, Martínez A. *J. Nat. Prod.* **2007**;70:1397-1405
- [44] Bidon-Chanal, A, Fuertes A, Alonso D, Pérez DI, Martínez A, Luque FJ, Medina M. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**;60:479-489
- [45] Bhowmik M, Khanam R, Saini N, Vohora D. *NeuroToxicology* **2015**;46:44-52
- [46] Domínguez JM, Fuertes A, Orozco L, del Monte-Millán M, Delgado E, Medina M. *J. Biol. Chem.* **2012**;287:893-904
- [47] Pérez DI, Conde S, Pérez C, Gil C, Simon D, Wandosell F, Moreno FJ, Gelpí JL, Luque FJ, Martínez A. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**;17:6914-6925